

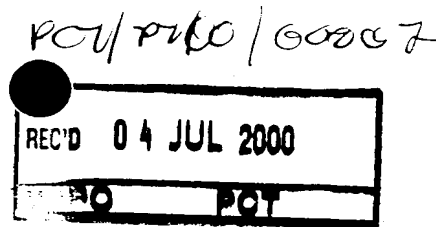
09/980819

S.  R.

PORTUGAL

MINISTÉRIO DA ECONOMIA

PTCC / 00007



INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

**CERTIFICADO DE PEDIDO
DE PATENTE DE INVENÇÃO**

EU

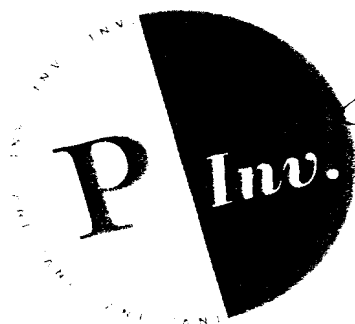
Certifica-se que os documentos em anexo estão conforme o original do pedido de patente de invenção nº. 102318.

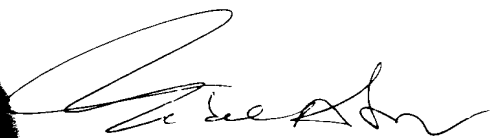
O pedido foi apresentado no INPI no dia 09 de Junho de 1999.

Lisboa, 16 de Junho de 2000.

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)




Pelo Presidente
do Instituto Nacional da Propriedade Industrial



**INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

Campo das Cebolas
1100 LISBOA
Telef.: (01) 888 51 51/2/3 - Fax: (01) 887 53 08 - 886 00 66
E-mail : inpi @ mail. telepac. pt

FOLHA DO RESUMO

PAT. INV. <input checked="" type="checkbox"/>	MOD. UTI. <input type="checkbox"/>	MOD. IND. <input type="checkbox"/>	D. E. S. IND. <input type="checkbox"/>	TOP. SEMIC. <input type="checkbox"/>	CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51)
N.º 102312 (11) DATA DO PEDIDO 9/26/99 (22)					
REQUERENTE (71) (NOME E MORADA) INSTITUTO DE CIÊNCIA APLICADA E TECNOLOGIA (ICAT) Edifício ICAT, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal CÓDIGO POSTAL					
INVENTOR(ES) / AUTOR(ES) (72) Maria Salomé Soares Pais/ Filomena Calixto e Rudy Planta					
REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE(S) (30)			FIGURA (para interpretação do resumo) COLAR FIGURA		
DATA DO PEDIDO	PAÍS DE ORIGEM	N.º DO PEDIDO			
EPÍGRAFE (54) Produção, por leveduras, de proteinases aspárticas de origem vegetal, com actividade proteolítica e de coagulação de leite de ovelha, vaca e cabra dentre outros.					
RESUMO (max. 150 palavras) (57) Esta invenção é válida para as enzimas recombinantes produzidas por leveduras transformadas com genes codificantes para proteinases ácido aspárticas de origem vegetal. Estas proteinases apresentam elevada actividade coagulante do leite de ovelha, vaca e cabra. Podem ser produzidas em larga escala por cultura, das leveduras transformadas em meio líquido. São secretadas para o meio de cultura e podem ser fornecidas sob a forma líquida ou liofilizada. A actividade destas enzimas é semelhante à da quimosina (enzima de origem animal) utilizada na produção de queijo a nível industrial. As proteinases aspárticas recombinantes diferem da quimisina na clivagem das caseínas. As enzimas vegetais recombinantes clivam a α , β e κ caseínas. A quimosina cliva apenas a κ caseína. Esta capacidade das proteinases aspárticas de origem vegetal, recombinantes, clivarem a α , β e a κ caseínas é responsável pelo sabor, aroma e textura especiais dos queijos produzidos.					

NÃO ESCREVER NAS ZONAS SOMBREADAS

DESCRIÇÃO

Produção, por leveduras, de proteinases aspárticas de origem vegetal, com actividade proteolítica e de coagulação de leite de ovelha, vaca e cabra dentre outros.

Introdução

A utilização de sistemas de expressão em leveduras tem constituído um meio de produção em larga escala de compostos de natureza diversa, sempre que esteja em jogo a produção industrial. No que se refere à produção de proteinases aspárticas de origem vegetal com aplicação industrial não há notícia sobre a sua expressão em leveduras, tendo em vista a sua produção para utilização a nível industrial.

O objecto da patente de invenção, que adiante se descreve, diz respeito à Construção de plasmídeos, transformação de estirpes de leveduras e produção de proteinases ácido aspárticas de origem vegetal.

Construção de Plasmídeos, Transformação de Estirpes de Leveduras e Produção de Proteinases de Origem Vegetal

A introdução do gene CYPRO11 codificante para uma proteinase de origem vegetal, constituiu o modelo de experimentação para controlo da expressão, em leveduras, de enzimas ácido aspárticas de origem vegetal.

Foram construídos dois vectores de expressão *Escherichia coli* – levedura, utilizando um plasmídeo multicópia do tipo 2 μ e um plasmídeo centromérico de baixo número de cópias. O gene de selecção utilizado foi o da deficiência em leucina (LEU2). A cassette de expressão continha o promotor GAL7 e quatro diferentes sequências "leader" a montante do gene heterólogo. A paragem da transcrição do gene heterólogo é realizada pelo terminador PGK1.

Dentre as diferentes sequências "leader" testadas (a prosequência nativa, a preSUC2-proCYPRO11, a preMF α -proCYPRO11 e a preproMF α) concluímos que a preMF α -proCYPRO11 foi a melhor sequência leader para a produção de proteinases ácido-aspárticas de origem vegetal, quer sejam as cyprosinas correspondentes às proteínas

4
modelo de origem vegetal, codificadas pelo gene CYPPO11, quer outras proteinases ácido aspárticas de origem vegetal com interesse comercial.

A pre-sequência da levedura MF- α é suficiente para promover a secreção da proteinase ácido aspártica para o meio de cultura, não sendo necessária a utilização da pro-sequência do gene. A pro-sequência nativa foi indispensável à produção da proteína activa.

A utilização de plasmídeos centroméricos de baixo número de cópias permitiu melhores resultados do que os plasmídeos multicópia do tipo 2 μ .

Foram testadas diferentes estirpes de leveduras, dentre as quais as estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* BJ1991 (MAT α *leu2 trp1 ura3-52 prb1-1122 pep4-3*), BJ2168 (MAT α *leu2 trp1 ura3-52 prc1-407 prb1-1122 pep4-3*), MT302/1c=a (*arg5-6 leu2-12 his3-11 his3-15 pep4-3 ade1*), W303-1a (MAT α *leu2-3,112 ura3-1 trp1-1 his3-11,15 ade2-1 can1-100 GAL SUC2*).

Estas estirpes foram mantidas em placas de agar YPD contendo extracto de levedura 1%, bacto-peptona, 2%, glucose 2%, e agar 1.5%.

As leveduras transformadas foram crescidas em meio SD (0.67% "yeast nitrogen base without aminoacids", DIFCO), 2% (w/v) glucose), suplementado com os aminoácidos apropriados às necessidades auxotróficas de cada uma das estirpes, à excepção da leucina. As culturas foram recolhidas e lavadas uma vez em água destilada estéril. As células foram ressuspensas em meio YPGal (extracto de levedura 1%, bacto-peptona 2%, galactose 4%) e utilizadas para inocular o mesmo meio numa densidade de $A_{600} = 0.2$. As culturas foram incubadas nas mesmas condições de cultura até atingirem densidades $A_{600} = 2, 6$ ou 10.

Das estirpes de leveduras testadas, a estirpe protease deficiente BJ1991, foi a que produziu e secretou para o meio de cultura, maiores quantidades de proteinase ácido aspártica com elevada actividade proteolítica e de coagulação do leite. A secreção das enzimas proteolíticas foi, no entanto, dependente do crescimento da cultura. A proteinase recombinante com actividades proteolítica e coagulante máximas foi obtida na fase estacionária do crescimento em meio YPGal ($A_{600} = 10$). Na fase exponencial ($A_{600} = 2$), as células das leveduras secretaram uma proteinase recombinante inactiva com elevado peso molecular, considerada a forma não processada da proteinase em que uma região específica dos genes de proteinases ácido aspárticas de origem vegetal denominada, inserto específico da planta não tinha sido removido.

A sub-unidade maior das proteinases recombinantes secretadas pelas leveduras, é glicosilada no único local possível de glicosilação e contém elevado número de cadeias de glicano tipo manose.

Preparação de anticorpos policlonais

O extracto proteico total utilizado para produção de anticorpos policlonais contra a proteinase ácido aspártica de origem vegetal com elevada actividade proteolítica e coagulante, foi obtido a partir de flores secas de *Cynara cardunculus* por maceração em almofariz em azoto líquido e extração com 50 mM de tampão TrisHCl a pH 8.3 (Heimgartner et al., 1990). As proteínas foram fraccionadas em 12% SDS-PAGE, utilizando 100 µg de extracto de proteína total por poço. O gel foi corado com uma solução de Azul Comassie 0.02% em água destilada. As bandas correspondentes à sub-unidade maior da enzima vegetal (31-32.5kDa no gel de SDS-PAGE) foram isoladas e o conteúdo de cada poço foi enviado para EUROGENTEC (Bélgica) para produção dos anticorpos.

Isolamento da Proteinase Vegetal e Análise por Western Blotting

O isolamento da proteinase vegetal recombinante a partir dos extractos celulares foi efectuada utilizando 30ml de células de leveduras crescidas até valores de densidade $A_{600} = 2, 6$ ou 10 . Após recolha, as células foram lavadas com água destilada, ressuspensas em 500 µl de tampão e rebentadas por agitação com esferas de vidro.

O isolamento da proteinase recombinante do meio de cultura foi efectuada após recolha do meio e concentração, cerca de 10X, por ultracentrifugação.

A concentração da proteinase foi determinada utilizando o Kit de análise de proteínas da Bio-Rad, seguindo as instruções dos fornecedores. 50 µg de extracto proteico total de células de leveduras ou 1.125 g de meio de cultura concentrado, foram analisados em SDS-PAGE 12%. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocellulose (Bio-Rad) utilizando um equipamento de electroforese Trans-Blot SD Semy-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad), de acordo com as instruções dos fornecedores. A detecção das proteínas foi efectuada utilizando o anticorpo policlonal CCMP1 preparado de acordo com o descrito na secção anterior e o Kit de Western Blotting BMChemiluminescence Western blotting da Boeringer Mannheim, de acordo com as instruções do fabricante.

4

Os resultados obtidos mostraram que as leveduras transformadas produzem a proteinase aspártica de origem vegetal e que a forma inactiva se encontra nas células na fase exponencial de crescimento, enquanto que a forma activa é secretada para o meio de cultura. Esta particularidade é determinante para a obtenção de bons rendimentos na extracção e purificação de proteinases ácido aspárticas de origem vegetal produzidas por leveduras.

Análise das Actividades Proteolítica e Coagulante da Enzima Recombinante de Origem Vegetal

A análise da actividade proteolítica foi efectuada seguindo o método de Twining (1984) modificado. A preparação da caseína marcada com isotiocianato (caseína-FTC) foi efectuada de acordo com as instruções do autor. A mistura de reacção continha 30 μ l de tampão citrato de sódio 0.2M, pH 5.1, 20 l de caseína FTC e 20 μ l de solução de enzima (3 μ g/ μ l no caso do extracto proteico total das células de levedura e 150 ng/ μ l no caso da proteína total do meio de cultura concentrado). Foram efectuados dois ensaios controlo substituindo a solução enzimática pelo tampão de reacção. As amostras foram incubadas a 37 °C durante 30 min. A reacção foi parada por adição de 120 μ l de ácido tricloroacético (TCA) 5% , à excepção de um dos controlos em que foi adicionada a mesma quantidade de tampão Tris HCl, pH 8.0, 0.5M (controlo positivo). As amostras foram centrifugadas e, uma aliquota 150 μ l da fracção sobrenadante foi diluída para 3ml com tampão Tris HCl 0.5M, pH 8.5. O controlo (sem enzima) em que a reacção foi parada com uma solução de TCA, foi utilizado para determinar a formação de compostos fluorescentes solúveis em TCA, sem intervenção da enzima. A fluorescência relativa das amostras foi determinada utilizando comprimentos de onda de excitação de 490nm e de emissão de 525nm, de um espectrofluorímetro Shimadzu RF-1501 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). A % de fluorescência relativa (%RF) foi calculada subtraindo os valores do controlo negativo aos valores e considerando os valores do controlo positivo, como 100% de RF. Para a análise estatística dos resultados, cada amostra possuía três réplicas e foram efectuadas três determinações independentes. Os dados obtidos foram analisados utilizando o teste Student's *t* ($\alpha=0.05$). A actividade proteolítica máxima, obtida para a melhor combinação / estirpe de levedura, foi de 15% RF/ μ de proteína. Este valor refere-se a condições de cultura standard, podendo ser aumentando em condições optimisadas para fins industriais

e utilizando estirpes Sec- ou seja estirpes seleccionadas em termos de capacidade máxima para a secreção da proteinase recombinante para o meio de cultura.

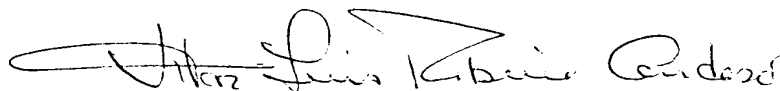
Determinação da Actividade coagulante


A determinação da actividade coagulante foi efectuada em tubos de ensaio, utilizando meio de cultura não concentrado, de acordo com o método seguinte: 10 ml de meio de cultura de células de levedura YPGal transformadas, foram adicionados a 3ml 12% de leite desnatado (Bacto-Difco) e 100 ml mM CaCl_2 . O pH do meio de cultura das culturas crescidas quer para $A_{600} = 6.0$ ou 10.0 foi aproximadamente de 5.0. Para o das culturas crescidas para $A_{600} = 2.0$ o pH do meio de culturas foi ajustado para 5.0 utilizando HCl. As amostras foram mantidas a 37°C até o aparecimento da coagulação. A coagulação foi evidente.

Lisboa, 09 de Junho de 2000

Pelo Requerente

O Mandatário





Produção, por leveduras, de proteinases aspárticas de origem vegetal, com actividade proteolítica e de coagulação de leite de ovelha, vaca e cabra dentre outros.

REIVINDICAÇÕES

- 1ª Culturas de leveduras transformadas, caracterizadas por conterem genes codificantes de proteinases ácido aspárticas e produzirem proteinases ácido aspárticas de origem vegetal secretadas sob a forma activa, para o meio de cultura. que podem ser extraídas do meio de cultura e purificadas e ser fornecidas sob a forma líquida ou liofilizada para utilização, a nível caseiro e industrial como enzimas de coagulação do leite.
- 2ª As culturas de leveduras transformadas descritas na reivindicação 1, caracterizadas pela integração estável de genes codificantes de proteinases aspárticas de origem vegetal.
- 3ª As culturas de leveduras transformadas, descritas nas reivindicações 1 e 2 caracterizadas pela capacidade de produzir proteinases ácido aspárticas, confirmada pela utilização de anticorpos produzidos contra proteinases ácido aspárticas do cardo e com actividade coagulante, confirmada por ensaios de coagulação do leite.

4ª As culturas de leveduras transformadas, descritas nas reivindicações 1, 2 e 3, caracterizadas pela capacidade de secretar as proteinases ácido aspárticas recombinantes para o meio de cultura.

5ª As culturas de leveduras transformadas, descritas nas reivindicações 1, 2, 3 e 4, caracterizadas pela capacidade de produzir proteinases ácido aspárticas recombinantes, capazes de coagular eficazmente, leite de diferentes origens, em especial de ovelha, vaca e cabra.

6ª As culturas de leveduras transformadas, descritas nas reivindicações 1, 2, 3, 4 e 5, caracterizadas pela capacidade de produzir proteinases ácido aspárticas que clivam as α , β e κ caseínas de leites de diferentes origens.


7ª As culturas de leveduras transformadas, descritas nas reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, e 6, caracterizadas por produzirem proteinases ácido aspárticas recombinantes, incluindo as designadas ciprosinas ou cardosinas, capazes de conferir ao queijo, sabor, aroma e tipo de pasta particulares.

Lisboa, 13 de Outubro de 1999


A Instituição Requerente

Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia (ICAT)

Os Administradores Executivos


Doutor Virgílio Meira Soares

(Professor Catedrático)


Doutora Luísa Maria Abrantes

(Professora Catedrática)